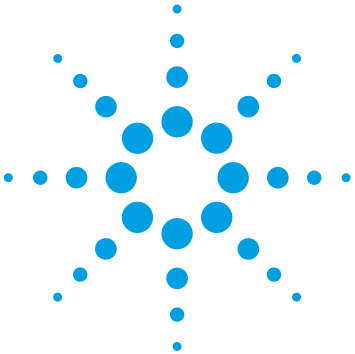
アジレント
オリゴDNA
マイクロアレイ
ハイブリダイゼーション



プロトコール

ユーザーズガイド
G4140-96010
Agilent オリゴDNAマイクロアレイ
ハイブリダイゼーションプロトコール

バージョン 4.11J
2003年 4月

キットに添付されているキット構成リストと
保管時の注意事項を必ずご確認ください。

アジレント シュアプリントテクノロジーで製造したDNAマイクロアレイ

注意：このキットは研究用です。
診断用には使用できませんので、ご注意ください。

Agilent Technologies

Notice

© 2002 Agilent Technologies, Inc.

部品番号

G4140-96010

改訂履歴

First edition, version 4.1, October, 2002
Printed in USA
Agilent Technologies, Inc.
BioResearch Solutions Unit
1601 California Avenue
Palo Alto, CA 94304 USA
2002年12月上記英語版をもとに日本語化
2003年 4月日本語プロトコールの部分変更による改訂

テクニカルサポート

日本における販売及び技術サポートは、横河アナリティカルシステムズ株式会社　フリーダイヤル0120-477-111までご連絡ください。

またアジレント関連製品の詳しい情報は次のURLでご覧になれます。

www.agilent.com/chem/dnasupport

テクノロジーライセンス

本品は、研究用です。臨床検査用ではありません。

ご購入された方へ

本製品は研究用のみにご使用ください。Agilent Technologies Inc. からの正式な許可なしに、Agilent製品を、再販、再販のための改造、もしくは製品の製造に使用することは出来ません。

プロトコールを日本語化するにあたり作業時間が発生するため、日本語プロトコールの発行は英語の最新バージョンに比べてどうしても遅れが生じます。製品ご購入の際は、必ず製品添付の英語版プロトコールのVersion をお確かめの上、日本語版が古い場合は、最新の英語版を参照くださるようお願い申し上げます。

制限的ライセンス

本ライセンスは、核酸アレイ（以下、アレイという）を購入した個人または法人（以下、購入者という）に対し、アレイおよびアレイの使用により得られたデータを、購入者が所属する組織内部における発現遺伝子の同定および／または遺伝子発現量の調査（臨床試験および商業利用の目的を含む）にのみ使用することを、Agilent Technologies, Inc.が許諾するものです。購入者は、本ライセンスでは以下を行うことを許諾されていないことに同意します。

(a)アレイおよびアレイから得られたデータを、発現遺伝子の同定および遺伝子発現量の調査以外の目的に使用すること。

(b)アレイおよびアレイから得られたデータを、遺伝子多型解析のために使用すること。

(c)臨床検査において、ある特定の個人の試料をアレイを使って分析して得られたデータが当該個人本人またはその個人の介護者の知り得るような状況において使用すること。

Agilent Technologies, Inc.および同社に使用許諾をしている第三者はいずれも、明示黙示を問わず、アレイ、その他のアレイおよびアレイ上の核酸の製造、使用、販売および輸入を許諾するライセンスを供与するものではありません。購入者は、本ライセンスにより、アレイの使用により得られたデータを第三者に販売することはできません。

注　意　本マークは、無視して取り扱いを誤った場合、物的損害が発生する潜在的危険の存在を示しています。

目　次

はじめに 4

キットの内容 7

必要な機器・器具及び試薬 7

安全上の注意 9

実験上の一般的な注意 9

試薬の準備 10

- 10x コントロールターゲット 10
- 洗浄バッファ 1 10
- 洗浄バッファ 2 10

ハイブリダイゼーション 12

- ハイブリダイゼーションチャンバの組み立て 12
- 2x ターゲットソリューションの準備 13
    - cRNAターゲットソリューションを調製する場合 14
        - 1x ハイブリダイゼーションソリューションの調製 14
- Cyanine 3- と Cyanine 5-ラベル化cRNA のハイブリダイゼーション 15

スライドの洗浄 16

ハイブリダイゼーション後のマイクロアレイの画像化 18

付録１．マイクロアレイのレイアウトと位置 21

付録２．情報資産アクセス協定（非常に重要です。必ずお読みください。） 23

ご購入された方へ

本製品は研究用のみにご使用ください。Agilent Technologies Incからの正式な許可なしに、Agilent製品を、再販、再販のための改造、もしくは製品の製造に使用することは出来ません。

はじめに

本書はAgilent Technologies の *in situ* 合成オリゴDNAマイクロアレイの ハイブリダイゼーションと洗浄プロトコールです。このプロトコールは、Agilent社のカタログオリゴDNAマイクロアレイまたはカスタム製造のオリゴDNAマイクロアレイの両者に適用できます。（デポジションタイプのアラビドプシス1 オリゴDNAマイクロアレイには適用できませんので、ご注意ください。）

このハイブリダイゼーションプロトコールは、Agilent社のリニア増幅＆ラベル化キットを用いて調製したCyanine 3、Cyanine 5 ラベル化cRNA をターゲットとして、マイクロアレイにハイブリダイゼーションさせることを前提としています。Agilent 社のラベル化キットは、Agilent 社のDNA マイクロアレイに合わせて最適化されています。弊社では、アレイにあわせて最適化されたAgilent 社のラベル化キットの使用を強くお奨めしています。他のプロトコールで調製したcRNA またはcDNA を、本プロトコールに従ってハイブリダイゼーションに用いた場合、問題の生じるケースがあります。Agilent 社以外のラベル化キットを用いてハイブリダイゼーションを行って問題が生じた場合、サポートの対象外になりますことをご了解ください。沈殿させたcRNAまたはcDNAは、必ずNuclease-Free水に溶解させてください。また、ハイブリダーゼーション用バッファは、必ずこのプロトコールに示された専用のキットをお使いください。バッファの組成は非常に重要で、指定以外のバッファを使用した場合、アレイに深刻なダメージを与える可能性があります。

本プロトコールには初めて実験される方がそれぞれの手順を行うのにかかるおおよその時間を記しています。ただしこれらは、実験手順への慣れや、一度に扱うアレイの枚数によっても変わりますので、あくまで参考として目安にしてください。

実験を成功させるため、実験を始める前に必ず
本プロトコール全体に目を通してください。

Notes

キットの内容

マイクロアレイキット：

- オリゴDNAマイクロアレイ ハイブリダイゼーション ユーザーズガイド
- 1x3 インチスライドグラス（1x 22K マイクロアレイまたは2x 8.4K、11Kマイクロアレイ／スライド）
- スポット情報を載せたCD

スライドグラスの保管は、ラベルに記載されている保管条件に従ってください。アレイが入っている銀色のパッケージを開封した後は、暗所、室温で、真空デシケータまたは窒素パージ環境下で保存してください。

ハイブリダイゼーションキット: 5184-3568

試薬
25x フラグメンテーションバッファ（100µL）
2x ハイブリダイゼーションバッファ（2.5mL）
10% Triton X-102（4mL）
10x コントロールターゲット

表 1. キット内容

本キットは、10枚分のスライドグラスにハイブリダイゼーションさせるのに必要な量が含まれています。（1 スライドグラスにアレイが 2 枚載っているフォーマットでは、20枚のアレイにハイブリダイゼーションできます。1 スライドグラスにアレイが 1 枚載っているタイプは、10枚のアレイに使用できます。）
試薬はそれぞれラベルに記載された条件で保管してください。室温指定の試薬は暗所で保管してください。

必要な機器・器具及び試薬

必要な機器・器具

- マイクロアレイチャンバ（詳細については表 2 をご参照ください）

必要な製品・消耗品	8.4K	11K	22K
ハイブリダイゼーションチャンバ（ステンレススチール）	G2530A	G2533A	G2531A
ポリプロピレンバッキング、ガスケット、セプタ（消耗品）（チャンバに10スライドグラス分付属）	G2530-60002	G2533-65002	G2531-60002
Agilent 8.4K *in situ* ハイブリダイゼーション チャンバクイックスタートガイド（チャンバに付属）	G2530-90001	–	–
Agilent 11K *in situ* ハイブリダイゼーション チャンバクイックスタートガイド（チャンバに付属）	–	G2533-95001	–
Agilent 22K *in situ* ハイブリダイゼーション チャンバクイックスタートガイド（チャンバに付属）	–	–	G2531-90001

表 2. マイクロアレイチャンバに必要な製品・部品番号

- マイナスドライバー
- ピンセット（清潔なもの）
- パウダーフリー手袋
- マイクロピペッター
- ピペットチップ（滅菌済ヌクレアーゼフリー）
- 1.5mL エッペンチューブ（滅菌済ヌクレアーゼフリー）
- 高速遠心機
- ボルテックスミキサー
- アイスバケツ
- タイマー
- ヒートブロックまたはウォーターバス（60℃）
- 1 mL シリンジ（Becton-Dickinson P/N 309602）
- 25ゲージ 5/8" 針（Becton-Dickinson P/N 305122）
- 0.2 µm フィルターユニット（1000 mL）
- ハイブリダイゼーションオーブン（Robbins Scientific モデル400 型番1040-60-1AG 温度設定60℃）
- アジレントチャンバ用ハイブリダイゼーションローター（Agilent G2530-60020）
- スライド染色用ディッシュ２ケ（Wheaton cat. no. 900200 またはそれ相当のもの）
- パイレックス製スライド染色用ディッシュまたはガラス容器 ハイブリダイゼーションチャンバが４ケ入れられるサイズ
- スライドラック
- スターラー（1）
- 回転子（中2、大1）
- フィルターエアガン（日本マイクロリス社 P/N WGGB01KAG）を取り付けた窒素ガス
- 窒素パージボックスまたは真空デシケータ（スライドの保存用）
- 1L ビーカー

必要な試薬

- リニア増幅したCyanine 3- ラベル化cRNA（Agilent リニア増幅＆ラベル化キットプロトコールをご参照ください）
- リニア増幅したCyanine 5- ラベル化cRNA（Agilent リニア増幅＆ラベル化キットプロトコールをご参照ください）
- ヌクレアーゼフリー水（Invitrogen cat. no. 10977015）
- 20x SSC（Amresco P/N 0804）
- Milli-Q 水

注　意 Milli-Q 水はすべてがヌクレアーゼフリーではありません。きちんとメインテナンスされ、モニターされたMilli-Q水システムのみを使用ください。使用前にMilli-Q水のチェックを行ってください。

安全上の注意

1. 実験にあたっては、必ず適切な服装（白衣、手袋、防護メガネ、マスクなど）を着用してください。
2. Cyanine 3-CTP とCyanine 5-CTP は発癌性物質を含んでいます。吸引、誤飲、皮膚への直接の接触は避けてください。
3. 本キット中のハイブリダイゼーションバッファには塩化リチウム（LiCl）が含まれています。
   - 塩化リチウム（LiCl）には中枢神経系への毒性があります。
   - 催奇性があり、乳児に悪影響を与える可能性があります。
   - 不妊を誘発する可能性があります。
   - 吸入、皮膚接触、誤飲により、害を引き起こします。必ず適切な白衣、手袋、マスク、防護めがね等を着用してください。
4. ハイブリダイゼーションバッファにはラウリル硫酸リチウム（LLS）が含まれています。
   - ラウリル硫酸リチウム（LLS）は毒性があり、目、気管器系、皮膚に炎症を起こす可能性があります。
   - 必ず適切な白衣、手袋、マスク、防護めがね等を着用してください。
5. キットには Triton X-100 とTriton X-102が含まれています。
   - どちらも吸引により害を引き起こします。皮膚接触、誤飲も避けてください。
   - 目への接触は特に危険で、大きな害を引き起こす可能性があります。目に入った場合は少なくとも15分間以上水で洗い流し、医療のアドバイスを受けてください。

これらのMaterial Safety Data Sheets（MSDS）は、アジレント社のWEBから入手することができます。

www.chem.agilent.com

実験上の一般的な注意

- 実験にあたっては、必ずご所属のラボの安全ガイドに従ってください。
- RNaseのコンタミネーションを防ぐために、実験中はパウダーフリーの手袋を着用し、ヌクレアーゼフリーの溶液およびピペットチップを使用してください。
- 実験スペースは常に清潔に保ってください。
- ハイブリダイゼーションバッファ、洗浄バッファを取り扱うときはRNaseを使った器具は**絶対**に使わないで下さい。
- Cyanine 3とCyanine 5は光で分解します。出来る限り光にあたらないように注意して使用してください。保管時，反応時は必ず遮光してください。
- －20℃、1.5mLエッペンチューブで保管したストックソリューションは、使用前に以下の手順で解凍してください。
  a. 解凍するときは室温以上の温度をかけないようにしてください。
  b. 解凍後は軽くボルテックスし、5-10秒ほどスピンダウンさせて蓋や壁についた液を集めてください。
  c. 使用するまで、オンアイスの状態で保管してください。
- ハイブリダイゼーションオーブンは事前に必ず60℃に設定してください。
- **マイクロアレイ取り扱い時の注意：**スライドグラスの縁は鋭利です。手袋をはめ、十分注意して取り扱ってください。スライドグラスの表面には**決して**手を触れないようにしてください。

実験を開始する前にプロトコール全体をお読みください。

I. 試薬の準備

10x コントロールターゲットの準備（必要時間 5分）
軽くスピンダウンしてペレットをチューブの底に集めた後、ヌクレアーゼフリー水0.5 mLをコントロールターゲットに加えます。軽くボルテックスをして、溶解させます。暗所 - 20℃で約2ヶ月まで保存できます。使用前に凍結した溶液を解かした時には、軽くボルテックスをして完全に溶解してください。

洗浄バッファ 1 ：6x SSC, 0.005% Triton X-102
（必要時間 10分）

1. 以下の試薬（表3）をヌクレアーゼフリーのメスシリンダーに加えます。

試薬	量（mL）
20x SSC	300
10% Triton X-102	0.5
脱イオン、Nucelase Free水（Milli-Q水）	700
合計	**1000**

表 3. 洗浄バッファ1 に必要な試薬

2. 溶液を0.2 µmの滅菌フィルターユニットに通します。
3. 蓋を閉め、溶液を混ぜます。
4. 室温で保存します。

洗浄バッファ 2：0.1x SSC, 0.005% Triton X-102
（必要時間 10分）

1. 以下の試薬（表4）をヌクレアーゼフリーのシリンダーに加えます。

試薬	量（mL）
20x SSC	5.0
10% Triton X-102	0.5
脱イオン、Nucelase Free水（Milli-Q水）	995
合計	**1000**

表 4. 洗浄バッファ2に必要な試薬

2. 溶液を0.2 µmの滅菌フィルターユニットに通します。
3. 蓋を閉め、溶液を混ぜます。
4. 4℃で保存します。

チャンバと以下の試薬は
ハイブリダイゼーションの直前に準備します。

II. ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションチャンバの組み立て（必要時間 15分／チャンバ）

1. ステップbyステップのインストラクションは、各チャンバに付属しているAgilent ハイブリダイゼーションチャンバクイックスタートガイドを参考にしてください。**G2530-90001**を8.4Kアレイに、**G2533-95001**を11Kアレイに、**G2531-90001**を22Kアレイに使用してください。

マイクロアレイ　取り扱い上の注意事項

- スライドグラスの片面に、22Kフォーマットは１枚のアレイが、8.4Kまたは11Kのフォーマットは２枚のアレイがプリントされています。これらのマイクロアレイは“Agilent”という文字の入ったバーコードラベルが付いた面にプリントされています。以下、アレイがプリントされている側を**active**サイドと呼びます。数字だけのバーコードラベルが付いている面は、**inactive**サイドになります。
- ハイブリダイゼーションを行う際に、きちんとアレイがプリントされている側に溶液をアプライすることが非常に重要です。“Agilent”の文字がついたバーコード側を上に向けて、ハイブリダイゼーションチャンバの上にそっとアレイを置いてください。この向きにセットするとactiveサイドが上を向いた状態になります。

ダブルバーコードが付いたスライドグラスの例

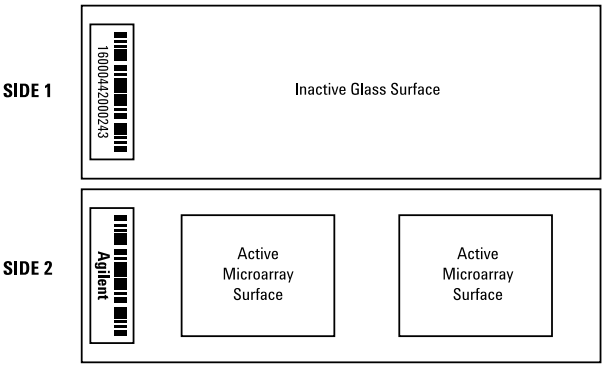


図1. オリゴDNAマイクロアレイ

- マイクロアレイに損傷を与えないために、スライドグラスの取り扱いには十分注意してください。パウダーフリーの手袋をはめて、スライドグラスのふちの部分を持つようにします。マイクロアレイ表面は**決して**触らないでください。もしマイクロアレイ表面に触れてしまうと、修復できない傷がマイクロアレイについてしまいます。
- ハイブリダイゼーション中、及び洗浄中に、マイクロアレイの表面を決して乾かさないように注意してください。乾かしてしまうと、その部分が跡になって残る怖れがあります。

2x ターゲットソリューションの準備（必要時間 5分／マイクロアレイ）

2. 1.5 mLのヌクレアーゼフリー水を使います。
3. お使いになるアレイのフォーマットで、試薬の必要量が変わります。以下のステップは、ご使用になるアレイフォーマットをよくご確認のうえ、実施ください。（カスタム（受託合成）アレイで25merの長さのプローブがプリントされたアレイを使用されている方は、以下の手順につきましてはお問い合わせください。）

cRNA ターゲットソリューションを調製する場合
試薬：リニア増幅＆ラベル化キット
アレイ：60mer マイクロアレイ

8.4K or 11Kマイクロアレイ	22Kマイクロアレイ
0.25µg リニア増幅 Cyanine 3ラベル化cRNA	1.0µg リニア増幅 Cyanine 3ラベル化cRNA
0.25µg リニア増幅 Cyanine 5ラベル化cRNA	1.0µg リニア増幅 Cyanine 5ラベル化cRNA
25µL 10x コントロールターゲット	50µL 10x コントロールターゲット
適量 ヌクレアーゼフリー水	適量 ヌクレアーゼフリー水
最終量：125µL	最終量：250µL

表 5. 60merマイクロアレイ用 2x cRNAターゲットソリューションの準備

4. ヌクレアーゼフリー水の量は cRNAサンプルの濃度によって異なります。
5. 必要であれば、2x ターゲットソリューションを暗所 -80℃で1ヶ月間保存することができます。使用する前には解凍し、ボルテックスした後、5〜10秒スピンダウンしてください。

1x ハイブリダイゼーションソリューションの準備 （必要時間 40分）

6. 2x cRNAターゲットソリューションが冷凍保存してある場合は解凍し、使用までオンアイスで保存します。

注 意 各マイクロアレイ 1 つごとに、2x ターゲットソリューションが必要になります。

7. 使用されるマイクロアレイのフォーマットに合った、以下の1x ハイブリダイゼーションソリューションを準備します。

8.4K or 11K マイクロアレイ（1チューブ分）	22Kマイクロアレイ（1チューブ分）
125 µL 2x ターゲット ソリューション	250 µL 2x ターゲット ソリューション
5 µL 25x フラグメンテーションバッファ （ハイブリダイゼーションキットより）	10 µL 25x フラグメンテーションバッファ （ハイブリダイゼーションキットより）
<フラグメンテーションステップ> **8. ボルテックスしてよく液を混合します。60℃のウォーターバスで30分インキュベーションします。必ず遮光してください。** **9. 30分後、フラグメンテーションをストップさせるためにハイブリダイゼーションバッファを加えます。**	
125 µL 2x ハイブリダイゼーションバッファ （ハイブリダイゼーションキットより）	250 µL 2x ハイブリダイゼーションバッファ （ハイブリダイゼーションキットより）
最終量（1マイクロアレイあたり） 255 µL	最終量（1マイクロアレイあたり） 510 µL

表6. 1x ハイブリダイゼーションソリューションの準備

10. ピペットでゆっくりと液を混合させます。泡を立てないように十分に気をつけてください。高速でボルテックスを行うと泡が発生しますので、ボルテックスは使用しないようにしてください。
11. 高速遠心機でスピンダウンして、蓋や壁についた液を底に集めます。
12. 直ちにハイブリダイゼーションに使用してください。**保存はできません。**次のStep13に進んでください。

Cyanine 3とCyanine 5 ラベル化cRNAのハイブリダイゼーション（必要時間 5分／マイクロアレイ＋17時間ハイブリダイゼーション）

注　意 各マイクロアレイに正しいサンプルをハイブリダイゼーションさせるために、ハイブリダイゼーションチャンバにラベル（番号など）してください。ハイブリダイゼーションチャンバに半永久的な印をつけるなら、金属部分に細いひっかき傷を入れる方法がお奨めです。もしマジックで印（番号）をつけるなら、黒色以外のカラーマジックの使用は避けてください。マジックで印をつけた場合、マジックの色素が、洗浄中にチャンバから溶け出して、アレイのバックグランドになる危険性があることをご承知置きください。

注　意 ハイブリダイゼーションオーブンはあらかじめ60℃に設定しておきます。

13. 各マイクロアレイに、25ゲージの針をセプタに刺し込みます。マイクロアレイごとに2つセプタがありますが、どちらか一つに針を刺し込んでください。
    - セプタの中心は空洞があります。この正しい位置に針を差し込むと、抵抗感は感じません。
    - この針はハイブリダイゼーションソリューションを注入するときの「空気の抜け道」となります。
14. 1mLのシリンジに別の針を取り付けます。
15. **静かにゆっくりと**ハイブリダイゼーションソリューションをシリンジで吸い込みます。この時、**泡ができないように十分に注意してください。**
    - 8.4Kまたは11Kマイクロアレイに必要なハイブリダイゼーションソリューションは **250 µL**です。8.4Kマイクロアレイはスライドに2枚プリントされています。
    - 22Kマイクロアレイに必要なハイブリダイゼーションソリューションは **500 µL**です。
16. 高速遠心機でチューブをスピンダウンさせます。蓋や壁についたハイブリダイゼーションソリューションをチューブの底に集めます。残っている液をさらにシリンジで吸い込みます。
17. ゆっくりとシリンジの針を（ステップ13で針を取り付けていないほうの）セプタに刺し込みます。ハイブリダイゼーションソリューションをチャンバの中に入れます。
    - 針は確実にセプタの中心部に刺します。セプタの中心は空洞があります。この正しい位置に針を差し込むと、抵抗感は感じません。
    - チャンバの裏側を見ながら、泡が入っていかないように注意してハイブリダイゼーションソリューションを入れます。もし万一泡を入れてしまったら、

空気の抜け道の方のニードル側に泡が集まるように、チャンバを傾けて静かにタッピングします。

18. 8.4Kまたは11Kマイクロアレイを使用している場合は、もう一方のアレイも同じようにハイブリダイゼーションミックスを入れます。

19. セプタから針を取り除きます。使い終わった針は、ご所属の研究室の安全ガイドに従って適切に処分してください。

20. 泡が入ってしまった場合は、泡が自由に動くことができるかどうか、チャンバの裏側から確認します。

注　意 60℃でのハイブリダイゼーションの間に、泡は発生します。これらの泡はハイブリダイゼーションの間、アレイ表面を動き回ることで、むらのないハイブリダイゼーションに寄与します。

21. ハイブリダイゼーションチャンバをあらかじめ60℃にセットしたオーブンのローターに差し込みます。ハイブリダイゼーション中に外れることがないように、両端をしっかりと差し込んで固定してください。

22. ハイブリダイゼーションオーブンの扉を閉め、**回転数を５に設定します。**

23. 他のスライドも同様にハイブリダイゼーションソリューションを入れます。

24. 60℃で17時間ハイブリダイゼーションさせます。

III. スライドの洗浄（必要時間 15分／スライド＋20分）

25. ハイブリダイゼーションが終わる前に、3つの染色用ディッシュを用意します。

- ディッシュ１；４つ以上のチャンバを使用しているときには、チャンバが４つ入るサイズの大きなディッシュ（ガラス容器）を準備して、室温の洗浄バッファ１を入れます。
- ディッシュ２；ディッシュの中に回転子とスライドラックを入れ、室温の洗浄バッファ１を加えます。このディッシュをスターラーの上にセットします。
- ディッシュ３；回転子を入れ、4℃の洗浄バッファ２を加えます。4℃に保つために、別の大きな容器にアイスをいれ、ディッシュ３をアイス上に置きます。洗浄バッファ２を４℃に保つため、必要なら随時、別容器の氷を追加してください。

注　意 ハイブリダイゼーションチャンバを分解する前に、必ず上記洗浄バッファの入った３種類のディッシュ全てを準備してください。洗浄の各ステップは、途切れなく効率的に行うことが重要です。洗浄の途中に、準備不足のための待ち時間が発生しないように注意してください。

26. オーブンから４つのハイブリダイゼーションチャンバを取り出します。泡が形成されているか、また泡が自由に動いているか確認してください。

27. 室温の洗浄バッファ１がはいった大型ディッシュ１にチャンバを入れます。

28. ４つのチャンバを洗浄バッファ１中で同時に分解していきます。ランダムにネジを緩めます。このステップは途中で中断せずに、迅速に行ってください。ネジはランダムに緩めていくように注意してください。必要であればドライバー、ピンセットを使用します。

注　意 スライドによってはバッキングにくっついてしまうものもあります。慌てることなく、静かにバッキングからスライドを離します。マイクロアレイを傷つけないように、ご注意ください。

29. スライドグラスを取り出し、室温の洗浄バッファ１がはいったディッシュ２のラックにそっと差し込みます。

注　意 スライドグラスを扱う時は、バーコード部分かスライドグラスの縁を持つようにします。決してマイクロアレイに触れることがないように注意してください。

30. すべてのスライドをラックに差し込んでから、スターラーで洗浄バッファ1を攪拌します。中程度の回転数で、室温のまま10分間攪拌します。

31. スライドラックをディッシュ３に移します。ディッシュ３には4℃の洗浄バッファ２が入っています。ディッシュをアイスの入った入れ物ごとスターラーに置き、中程度の回転数で5分間攪拌します。（アイスで洗浄バッファ２を0−4℃に保ちます。）

32. スターラーを止め、ディッシュからスライドグラスを取り出します。フィルターエアガンがついた窒素ガスを使い、スライドを乾燥させます。

注　意 自然乾燥を防ぎ、手早く乾燥させます。液滴が残って自然乾燥すると、アレイイメージに跡となって残ります。

33. 蛍光強度を測定するため、スライドをスキャナーにのせます。すぐにスキャンできない場合は、スキャンするまで窒素パージボックスに入れ暗所で保管します。蛍光の退色を防ぐために、乾燥が終わった後はできるだけ早くアレイをスキャンすることをお奨めします。

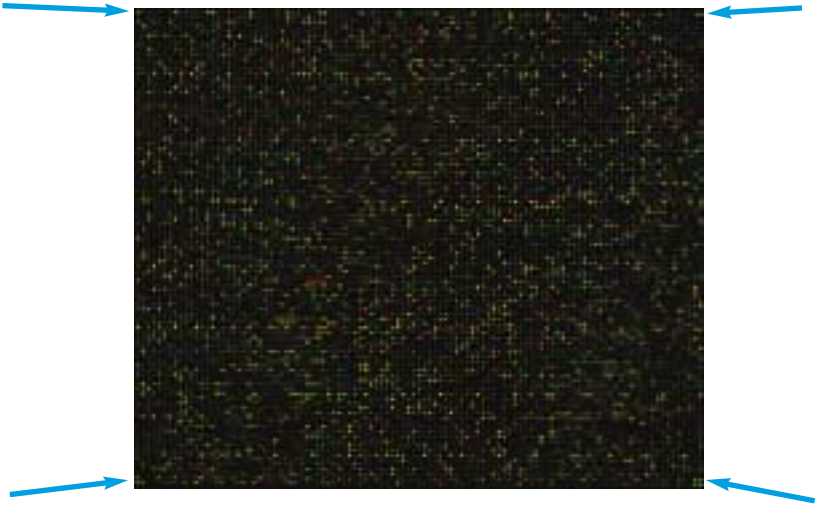
34. スキャン後、スライドはポリプロピレンスライドボックスに入れ（コルクなどの詰め物をしないでください。）、真空デシケータまたは窒素パージボックスに入れて暗所で保存します。Agilentでは真空デシケータの方が色素の退色が見られるため、窒素パージボックスをお勧めしています。

ハイブリダイゼーション後のマイクロアレイの画像化

何種類かのマイクロアレイ用スキャナーが市販されています。アジレントオリゴDNAマイクロアレイはCyanine 3とCyanine 5でラベル化したcRNAを使用しているので、Cyanine 3とCyanine 5を励起し、蛍光を検出できるスキャナーが必要です（532と633 nmのレーザー）。アジレントではアジレントマイクロアレイスキャナー（製品番号G2565BA）を推奨しています。アジレントマイクロアレイスキャナーはダイナミックオートフォーカス機能を備えており、高感度でアレイを読み取ることができます。さらに、アジレントのマイクロアレイと組み合わせると、スポットの数値化を自動で行うことができます。アジレント社以外のスキャナーをご使用の場合は、そのスキャナーの取り扱い説明書をご参照ください。スキャン時にスライドグラスを取り扱う際は、“Agilent”の文字が入ったバーコードのある側にアレイがプリントされていることにあらためて注意してください。

付録の項目に、アジレントアレイのスライド上のスポット位置を記した図があります。アジレント以外のスキャナーをお持ちのお客様は、この情報をご参照の上、各スキャナーの取り扱い説明に従ってスキャンを行ってください。

アジレントオリゴDNAマイクロアレイでは、スキャン後の画像でアレイの四隅を示すために、それぞれ異なるコントロールプローブが緑色の蛍光を発します。スキャン後の画像でご確認ください。



矢印はアレイの向きを判断するためのコントロールプローブ位置を示しています。コントロールプローブはハイブリダイゼーションキットに含まれているコントロールターゲットと特異的にハイブリダイズします。

注　意 アジレントのフィーチャエクストラクションソフトウェアを使用する場合は、左上が１、右上が２、左下が３、右下に４つのコントロールプローブが位置します。コントロールプローブセットが１つ及び３つならんでいる隅が、バーコードに近い側に位置しています。

22Kアレイ及び11Kアレイでは、スキャン後の画像にコントロールプローブによるジグザグ模様が現れます。これらの模様は、ハイブリダイゼーションキット中のコントロールターゲットが、アレイ上のコントロールプローブとハイブリダイゼーションしたものです。（カスタム（受託合成）アレイでは、この模様は現れません。）

アジレントオリゴDNAマイクロアレイキットに添付されているCD-ROMには、アレイのレイアウトが記載されているファイルが含まれています。“アレイデザインファイル”（ファイル名に_D_が入っている）には、アレイ上の各プローブの情報（GenBank ID、SwissProt Protein ID、Gene Annotation他：アレイの種類により、プローブ情報は異なります）が含まれています。

注　意 “アレイデザインファイル”には、3 種類のファイルフォーマットがあります。.xmlの拡張子がついたGEMLファイルは、アジレントのマイクロアレイスキャナーに付属しているフィーチャエクストラクションソフトウェアで使用されます。.galの拡張子がついたGALファイルは、Axson社製のスキャナーに付属しているデータ解析ソフトウェアで使用できます。.txtの拡張子がついたテキストファイル（tabで区切られている）は、他社製のソフトウェアでデータ解析をするときにご利用ください。付録を参照して、お使いのスキャナーの読み取り向きに合わせたテキストファイルをお使いいただくように、ご注意ください。（間違ったテキストファイルを使うと、アレイ上の各スポットに遺伝子が誤ってアサインされる重大な間違いを引き起こします。）各ファイルのより詳しい情報については、CD-ROMにあるREADME.txtをお読みください。

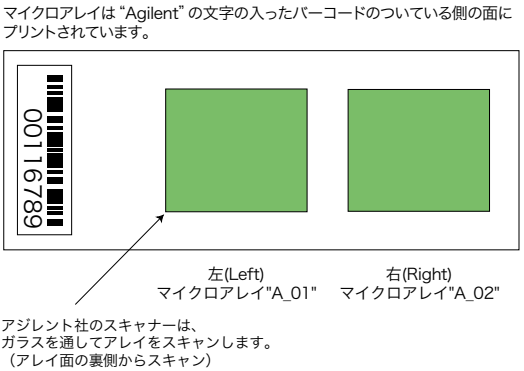
注　意 **アジレント社以外のスキャナーを使用してスキャンする場合：**アジレント社のスキャナーは、アレイ面を裏側からスキャンしますが、アジレント社以外のスキャナーでは、アレイ面の表側からスキャンするタイプが多いです。アジレント社以外のスキャナーを使用して、画像ファイルを作成した場合、その画像がミラーイメージになっていたり、回転していることがあります。もし、お使いのスキャナーに、画像の反転や回転機能がついていたら、その機能を利用して、各スポット（フィーチャ）番号と、アレイデザインファイルのフィーチャ番号が一致するようにしてください。もし、お使いのスキャナーに画像の反転や回転機能がついていない場合は、お手持ちのスキャナーでのアレイの読み取り方向をよく確認した上で、アレイのデザインファイルをスキャナーの画像ファイルに適合するように変える必要があります。不明な点は、横河アナリティカルシステムズ株式会社のバイオサポート担当（TEL0120-477-111）に直接ご確認ください。

ご使用のオリゴDNAマイクロアレイとスキャナーの画像ファイルに適合したレイアウトを、添付CD-ROMの中から選んでご使用ください。
付録の中には、表側からスキャンするタイプのスキャナーで読み取った、典型的な画像ファイルとフィーチャの位置のマップがあります。
またアジレント社のDNAマイクロアレイサポート用のホームページも合わせてご参照ください。
www.agilent.com/chem/printit (enter code BR3003)

注　意 **オリゴDNAマイクロアレイのレイアウトとフィーチャの位置：**以下の付録の中から、お使いのオリゴDNAマイクロアレイの種類にあったレイアウトファイルをご参照ください。特に、アジレント社以外のスキャナーを使用している場合は、前述のように画像が反転や回転をしている場合が多いので、付録をよく参照して、各フィーチャにアレイデザインファイル中の正しいフィーチャ番号をアサインするようにしてください。

付録 1：アジレント社DNAマイクロアレイのレイアウトと位置

アジレント社のスキャナーで読み込んだ画像ファイルでの
アジレントDNAマイクロアレイ　レイアウト例



Agilent Microarray Slide Holder

アジレントオリゴDNAマイクロアレイのレイアウトは、アジレント社のスキャナーで読み込んで作成した1 x 3インチの画像ファイルのフィーチャのレイアウトを元に作られています。アジレント社のスキャナーは、専用のスライドフォルダーでしっかり固定したスライドガラスを通して、アレイの裏面をスキャンします。つまり、アジレント社のスキャナーでスキャンしているときは、アレイの裏面側（バーコードに数字のついている面）が表になり、アレイ面（バーコードにAgilentの文字が入っている）はスライドフォルダーの側を向きます。このようにアレイ面を裏返してスキャンすることにより、アレイ面をホコリなどから保護しています。

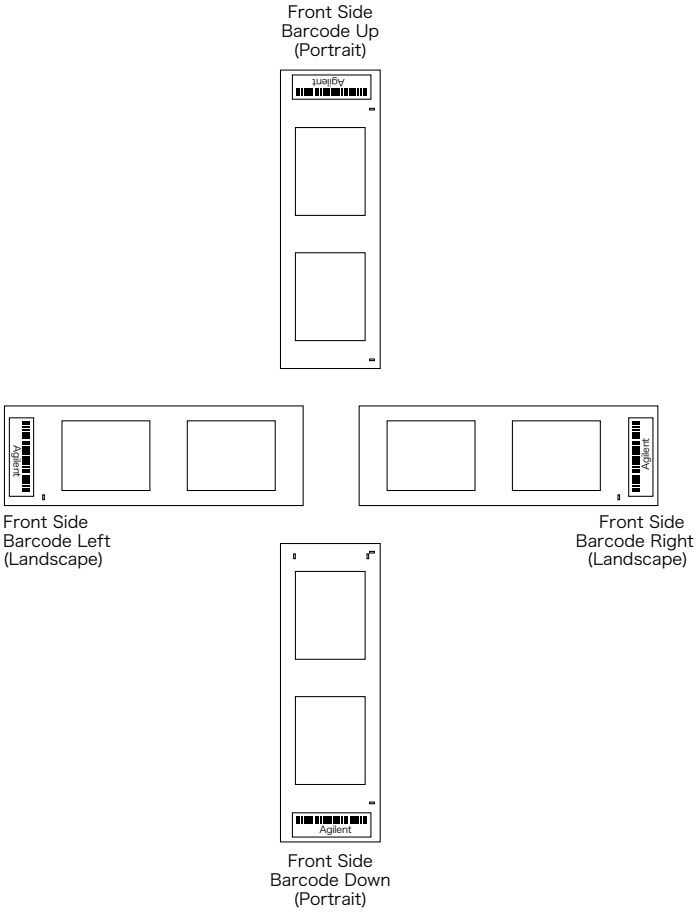
アジレントのオリゴDNAマイクロアレイキットに添付されているCD中の、“アレイデザインファイル”は、上図の通り、アレイを裏側（back side）からスキャンするアジレント社のスキャナーで、取り込んだ画像ファイルに合わせたレイアウトになっています。アジレント社以外のスキャナーで取り込んだ画像は、アレイを表側（front side）からスキャンするものがほとんどであるため、取り込んだアレイイメージは反転（ミラーイメージ）や回転しています。デザインファイルに基づいてフィーチャ番号を各フィーチャ（スポット）にアサインするときには、以下の記述を参照して十分注意してください。

アジレント社以外のスキャナーを使用してスキャンする場合：アジレント オリゴDNAマイクロアレイをスキャンして得られた画像について、次の点をよく確認してください。

1） アレイの表面側（front side）からスキャンをしているか。（バーコードにAgilentの文字がある側からスキャン）

2） 得られたイメージ画像が、スライドグラスを横方向（landscape）にスキャンしたものか。縦方向（portrait）にスキャンしたものか。（バーコードが得られたイメージに対して上下左右のどこに位置しているか）

アジレントオリゴDNAマイクロアレイキットに添付されているCD中の“アレイデザインファイル”は、前述のアジレント社スキャナーで読み込んだイメージを元に作られていますので、確認したイメージ画像の向きと方向によって、フィーチャの位置が変わり、フィーチャ番号を並べ替える必要があります。フィーチャ番号を並べ替えたデザインファイルは、アジレント社のwebサイトからダウンロードすることができますので、お使いのスキャナーの読み取り向きをよく確認したうえで、適切なデザインファイルをお使いください。 www.agilent.com/chem/printit（enter code BR3003）



付録 2：情報資産アクセス協定／Agilent Technologies Information Assets Access Agreement

I. 目的

1. Agilent Technologies（以下「Agilent」という）とユーザーは、Agilentがユーザーに対してAgilentの情報に関連する財産（以下「情報資産」という）へのアクセスを許諾することにより促進されるであろう取引関係を持つに至った。これに応じ、ユーザーとAgilentは、Agilentのあらゆる情報資産の機密性、完全性、有効性および物理的な安全性を保護するため、並びに、アクセスすることを認められていない者がAgilentのいかなるネットワーク、コンピュータおよび情報資産にもアクセスすることを防ぐため、この情報資産アクセス協定／Information Assets Access Agreement（以下「本協定」という）を締結した。情報資産へのアクセスは、本協定の元となるユーザーおよびAgilent間の取引関係を促進するためにのみ許諾される。情報資産を含む甲の一切の情報に関する財産につき、前記以外の目的のためにこれを使用することはできない。

2. ユーザーおよびAgilentは、両社間の取引関係を明確にするような他の契約または協定などを結んでいることを確認する。これらの合意文書は、本協定とは関係がなく、それら合意文書間で矛盾があった場合は、後から締結したものが優先される。

II. 情報資産の物理的保護

1. ユーザーは、ある特定の情報資産に対してアクセスすることをAgilentが認めたユーザーの従業員のみが当該情報資産へアクセスするよう、合理的と認められる程度の注意（ただし、善良なる管理者の注意義務を下回るものであってはならない）でもってこれを管理、実施しなければならない。いかなる場合であっても、ユーザーは、Agilentの書面による承諾なく、Agilentが認めていないユーザーの従業員、その他の者に対し、情報資産にアクセスさせることはできない。

   アジレントが承諾した身分確認手続を経て情報資産へのアクセスを認められたユーザーのみが、かかる情報資産にアクセスすることができる。

   ユーザーは、Agilentの書面による承諾がない限り、許諾を受けた以外のコンピュータシステムおよび情報資産を使用することはできない。なお、上述の使用の制限の定めについては、ユーザーがアクセスすることにつき許諾を受けた情報資産が、ユーザーがアクセスすることについて許諾を得ていない他の情報への入り口となっている場合にも、同様に適用されるものとする。

これら情報資産の使用の制限は、Agilentが物理的、論理的なセキュリティ対策を実施していない場合においても適用されるものとする。書面または電子メールで許諾を得ていない従業員が情報資産その他のAgilentの財産を使用することは、厳に禁じられるものとする。

2. 前項に加え、ユーザーは以下に同意するものとする。

   a. ユーザーは、パスワード、セキュリティトークン、ログオンスクリプト、その他情報資産へのアクセスに使用するハードウェアおよびデータへの物理的なアクセスを管理する。ユーザーは、Agilentの書面承諾なく、パスワード、セキュリティトークン、その他の身分確認情報を、複数の者の間で共有しない。ユーザーは、Agilentにより承諾を受けた特定の場所からのみ、情報資産にアクセスする。ユーザーがAgilentの施設外から情報資産にアクセスする場合については、Agilentは、情報資産へのアクセスに使用されるネットワークを書面または電子メールで特定するものとする。

   b. ユーザーは、本協定締結の基礎となるビジネスの目的のために情報資産へのアクセスがいまだ必要であることを保証するため、本協定に基づき情報資産へアクセスすることについて承諾を受けた各従業員個人を定期的に見直す。

   c. 本協定が適切に実施されるようユーザーの内部における調整を行い、本協定で定めた全ての規定および義務が常にユーザーにおいて確実に遂行かつ遵守されるよう取り計らう。

3. Agilentは、自らの判断により、また、何らの責任を負うことなく、いかなる個人や法人によるアクセス、および、いかなるシステムへのアクセスを、通知および理由なく拒絶し、制限し、または終了させることができる。

III. 電子機密情報の保護

1. ユーザー並びにその従業員および代理人（特に他の条項で規定しない限り、総称してユーザーという）は、Agilentから受領した電子機密情報を、Agilentの事前の書面による承諾なく、第三者に開示してはならない。ユーザーは、当該電子機密情報を、Agilentとのビジネス上の関係のため必要な範囲において、または、本協定の目的の範囲にのみ使用するものとし、また、ユーザーは、当該電子機密情報が許諾の範囲を超えて開示または使用されることを防ぐため、合理的な注意を払うものとする。

2. 本協定において「電子機密情報」とは、ユーザーが情報資産から取得する情報のうち、機密事項たる旨（例：秘、Restricted、Confidential、Privateなど）が表示された情報、および、機密事項たる旨が表示されていない情報であっても社会通念上機密情報であると考えられる情報を指すものとする。Agilentは、ユーザーが機密事項たる旨が表示されていない情報を受け取ることを防ぐため、合理的な対策を施すものとする。但し、前記に関わらず、ユーザーは、電子システムの性質上、これらの情報が誤ってユーザーに送られ、または、機密事項たる旨が誤って表示されずにユーザーに送られることがあることを認めるものとする。ユーザーは、社会通念上機密情報であると考えられる情報を受け取った場合は、当該情報

を機密情報ではないものとして扱うことなく、当該情報の機密性につき、Agilentに確認しなければならない。

3. ユーザーは、別途締結した機密保持に関する契約またはその他の契約上の規定に従ってユーザーに開示される機密情報に関しては、本協定により何らの義務を負うものではない。これらの情報に関し各当事者が負うべき義務については、当該機密保持に関する契約またはその他の契約上の規定に従うものとする。

IV. 情報公開に関する制限

1. ユーザーは以下の条件を満たす場合に限り、論文発表を出来る。論文発表できる雑誌は審査のある学術雑誌に限る。以下、「論文発表」と呼ぶ。

2. 論文の長さ、種類にかかわらず一つの論文で公表できるプローブ塩基配列は50プローブまでとする。

3. ユーザー、出版者、研究者、科学者、などその立場にかかわらず論文の著者または出版者は、論文のしかるべき場所に以下の文書を明記することに合意するものとする：Agilentの提供するアレイデザインファイル番号は次の書き出しで始める。

   ANY PUBLICATION OR PUBLIC DISCLOSURE OF OLIGONUCLEOTIDE SEQUENCES FOR USE WITH MICROARRAYS MAY ONLY BE REPRODUCED OR MANUFACTURED FOR YOU BY AGILENT TECHNOLOGIES, INC. BY REFERENCING THE CATALOG MICROARRAY PRODUCT NUMBER OR THE CUSTOM MICROARRAY DESIGN IDENTIFICATION NUMBER SUPPLIED BY YOU BY AGILENT.

   （日本語で投稿する場合は、横河アナリティカルシステムズから本文書の日本語版を入手すること）

4. 本協定により、ユーザーはAgilentに対して，第三者が必要とする製品をユーザーの秘密情報に基づきAgilentが製造する権利を与えるものとする。

V. 管理

1. 監査：Agilentは、事前通知をユーザーに行うことにより、ユーザーが本協定に基づく義務を遵守しているか否かにつき合理的な範囲内で監査することができるものとし、ユーザーは、当該監査に必要な情報を提供するなど、Agilentに協力するものとする。

2. 損害：ユーザーは、ユーザーが本協定に違反したことにより生じる全ての損失、損害、費用および経費を負担するものとし、これらからAgilentを免責するものとする。

3. ユーザーは、本協定に基づき情報資産へのアクセスが許諾されたユーザーの従業員または代理人が、本協定に基づく義務を熟知しており、かつ、それらの義務を負うことにつき書面で合意していることを保証する。これに加え、ユーザーの従業員または代理人は、各自がアクセスすることができる情報資産は何か、および、アクセスを妨げる論理的または物理的なセキュリティ方法が施されていない場合であって

も許諾を受けていない情報資産にはアクセスしない義務を各自が負っていること、について熟知しなければならない。

VI. その他

1. 本協定は、本書に署名するAgilentの法人が存在する国または地域の法に従って締結し、解釈されるものとする。
2. 本協定は、全ての付属文書を含め、本協定の主体に関する両当事者間の完全唯一の合意事項とする。また、本協定は、変更することができない。

Agilent Technologies
BioResearch Solutions Unit
1601 California Avenue
Palo Alto, CA 94304
Email: dna_microarrays@agilent.com

http://www.agilent.com/chem/dna
Part Number: G4140-96010

Agilent Technologies